第 37 卷第 22 期 2017 年 11 月 | 生 态 学 报 ACTA ECOLOGICA SINICA | Vol.37,No.22 Nov.,2017

DOI: 10.5846/stxb201609041803

唐海明,肖小平,汤文光,孙继民,刘杰,汪柯,李超,程凯凯,李微艳,孙耿.长期施肥对双季稻田甲烷排放和关键功能微生物的影响.生态学报,2017,37(22):7668-7678.

Tang H M, Xiao X P, Tang W G, Sun J M, Liu J, Wang K, Li C, Cheng K K, Li W Y, Sun G.Effects of long-term fertilizer treatments on CH_4 fluxes and key functional microorganisms in a double-cropping paddy field.Acta Ecologica Sinica,2017,37(22):7668-7678.

长期施肥对双季稻田甲烷排放和关键功能微生物的影响

唐海明*,肖小平,汤文光,孙继民,刘　杰,汪　柯,李　超,程凯凯,李微艳,孙　耿

湖南省土壤肥料研究所,长沙　410125

摘要:研究不同施肥措施对双季稻田甲烷(CH_4)排放特征的影响及其微生物学机理,对合理利用及评价不同施肥模式对水稻生长的影响具有重要意义。以长期施肥定位试验田为平台,采用静态箱-气相色谱法对施用化肥(MF:mineral fertilizer alone)、秸秆还田配施化肥(RF:rice residues plus mineral fertilizer)、30%有机肥配施 70%化肥(LOM:30% organic matter plus 70% mineral fertilizer)、60%有机肥配施 40%化肥(HOM:60% organic matter plus 40% mineral fertilizer)和无肥(CK:without fertilizer)条件下双季稻田 CH_4 排放及其微生物学机理进行了分析。结果表明,早稻和晚稻生长期,不同施肥处理稻田 CH_4 排放通量均显著高于 CK,表现为 HOM>LOM>RF>MF>CK。各处理间 CH_4 总排放量差异达显著水平,其大小顺序与排放通量趋势一致,以 HOM 处理为最高,比 CK 处理增加 105.56%,其次是 LOM 和 RF 处理,分别比 CK 处理增加 72.97%和 54.17%。关键功能土壤微生物测定结果表明,早稻和晚稻各个主要生育时期,各处理稻田土壤产甲烷古菌的数量变化范围为(3.18—81.07)×10^3 cfu/g,土壤甲烷氧化细菌的数量变化范围为(24.82—379.72)×10^3 cfu/g。稻田土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量大小顺序为 HOM>LOM>RF>MF>CK,各施肥处理均显著高于 CK;HOM、LOM、RF 处理显著高于 MF、CK 处理。双季稻田 CH_4 排放与稻田土壤产甲烷古菌、甲烷氧化细菌数量变化关系密切。采用有机无机肥配施促进了双季稻田生态系统 CH_4 的排放和关键功能微生物的数量。

关键词:施肥;双季稻;稻田;CH_4;土壤微生物

Effects of long-term fertilizer treatments on CH_4 fluxes and key functional microorganisms in a double-cropping paddy field

TANG Haiming*, XIAO Xiaoping, TANG Wenguang, SUN Jimin, LIU Jie, WANG Ke, LI Chao, CHENG Kaikai, LI Weiyan, SUN Geng

Hunan Soil and Fertilizer Institute, *Changsha* 410125, *China*

Abstract: Methane (CH_4) fluxes and their key functional microorganisms in a double-cropping paddy field are affected by long-term fertilizer treatment; thus, it was important to utilize and evaluate different fertilization regimes on rice growth. A manual static chamber-gas chromatography (GC) technique was used to verify the effects of different fertilizer treatments, which included mineral fertilizer alone (MF), rice residues plus mineral fertilizer (RF), 30% organic matter plus 70% mineral fertilizer (LOM), 60% organic matter plus 40% mineral fertilizer (HOM), and a control without fertilizer (CK), on CH_4 emissions from double-cropping paddy fields in subtropical regions of China and on the microbial mechanisms driving them. The results showed that the flux of CH_4 from the HOM, LOM, RF, and MF treatments was higher than that of

基金项目:国家自然科学基金项目(31571591,31201178);国家公益性行业(农业)科研专项(201503123)

收稿日期:2016-09-04;　　**网络出版日期:**2017-07-12

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: tanghaiming66@ 163.com

the CK treatment, and it varied with different fertilizer treatments in the following order: HOM > LOM > RF > MF > CK. Further, CH_4 emissions were significantly greater during the entire growth period for early and late rice in the HOM, LOM, RF, and MF treatments than in the CK treatment ($P < 0.05$). CH_4 emissions from paddy fields in the HOM, LOM, and RF treatments increased by 105.56%, 72.97%, and 54.17%, respectively, compared with the CK treatment. At the main growth stages of early and late rice, the abundance of methanogens under the different fertilizer treatments ranged from 3.18×10^3 cfu/g to 81.07×10^3 cfu/g, while that of methanotrophs ranged from 24.82×10^3 cfu/g to 379.72×10^3 cfu/g. The results indicated that the abundance of the methanogens and methanotrophs were significantly greater in the HOM, LOM, RF, and MF treatments at the main growth stages of early and late rice than they were in the CK treatment. Additionally, the abundance of methanogens and methanotrophs varied under the different fertilizer treatments in the following order: HOM > LOM > RF > MF > CK. Moreover, the abundance of methanogens and methanotrophs was significantly greater in the HOM, LOM, and RF treatments at the main growth stages than they were in the MF or CK treatments. CH_4 emissions were significantly correlated with the abundance of methanogens and methanotrophs during the whole growth period. Our results clearly demonstrated that CH_4 emissions from paddy fields and the abundance of key functional microorganism were promoted by the application of inorganic fertilizer combined with organic manure practices in a double paddy field ecosystem.

Key Words: fertilizer; double-cropping; paddy field; CH_4; soil microorganism

甲烷(CH_4)是大气中重要的温室气体,对地球生态系统的能量收支和全球气候变化有重要影响[1]。CH_4单位分子的增温潜能是CO_2的25倍[2],其气体浓度正以每年约1%的速度增长[3]。水稻是世界上主要的粮食作物之一,种植面积占粮食作物面积的1/3,其生产过程中伴随着CH_4等温室气体的产生,因此稻田在全球温室气体的计算中具有重要作用[4]。中国稻田面积约占世界水稻种植总面积的23%,位居世界第二,其中双季稻播种面积占我国水稻总播种面积的64.7%[5]。因此,中国稻田CH_4的排放受到国际社会的普遍关注,稻田温室气体的排放已成为我国近年来农田生态环境的研究热点。

影响稻田CH_4排放的因素较多,如稻田种植制度、作物种类、土壤耕作方式、秸秆还田方式、施肥措施(制度)、水分管理等,其中施肥措施是稻田CH_4排放重要的影响因素,包括肥料类型、施用量以及施用方式等[6-8]。已有研究认为,有机肥的施用会增加土壤CH_4的排放[9],施加有机肥能显著增加稻田土壤的甲烷氧化活性和甲烷排放通量[10]。郭腾飞等[11]研究结果表明,施用有机肥和氮肥均增加了CH_4和N_2O的排放,秸秆还田增加了CH_4排放,减少了N_2O排放。Zou等[12]研究指出有机物料的投入会增加全球增温潜势,因此不建议施肥中投入有机肥。研究表明,将秸秆转化为生物碳可以减缓CH_4排放,提高产量和土壤肥力[13];秸秆还田以及施入家禽粪肥对比单施化肥增加了温室气体增温潜势[14];土壤中施用有机物,如作物秸秆和有机肥均能显著促进稻田CH_4的排放[15]。也有研究认为,与单施化肥相比,有机无机肥配施能明显减少N_2O的排放,但有机肥的施用会增加土壤CH_4排放[16]。

目前,不同施肥措施对稻田CH_4排放、甲烷氧化活性和群落结构等方面已有很多研究报道[10,14,17],但长期有机无机肥配施对稻田CH_4排放通量影响的微生物学机理研究报告尚较少。有机物的施入能显著提高古细菌的数量和活性[17],并能为CH_4的产生提供大量的活性有机基质[18]。土壤微生物是影响CH_4排放的关键因素[19]。稻田CH_4排放与产甲烷古菌及甲烷氧化菌之间有着密切的关系,影响土壤中产甲烷古菌和甲烷氧化菌的因素,均会影响稻田CH_4的排放。长期定位试验是研究肥料对土壤微生物影响的最好方法之一。因此,本研究以28年长期定位施肥稻田为基础,开展有机无机肥配施条件下稻田CH_4排放通量和关键功能微生物的研究,以期阐明长期定位施肥对稻田CH_4排放通量和关键功能微生物的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

不同施肥模式定位试验始于 1986 年,在湖南省宁乡县农技中心内进行(112°18′ E,28°07′ N),该区域为典型的双季稻主产区,海拔 36.1 m,年均气温 16.8℃,年平均降雨量 1553.70 mm,年蒸发量 1353.9 mm,无霜期 274 d。试验地土壤为水稻土,河沙泥土种,种植制度为大麦-双季稻,肥力中等,排灌条件良好。1986 年试验前耕层土壤(0—20 cm)基础肥力为:有机质 29.39 g/kg、全氮 2.01 g/kg、全磷 0.59 g/kg、全钾 20.6 g/kg、碱解氮 144.1 mg/kg、有效磷 12.87 mg/kg、速效钾 33.0 mg/kg 和 pH 6.85。

1.2 试验设计及田间管理

试验设 5 个处理:(1) 化肥处理:施氮、磷、钾化肥,不施任何有机肥(MF: mineral fertilizer alone);(2) 秸秆还田+化肥处理:施用晚稻秸秆与化肥处理(RF: rice residues plus mineral fertilizer);(3) 30%有机肥处理:有机肥的氮含量占总施氮量的 30%,其余 70%的氮为化肥氮(LOM: 30% organic matter plus 70% mineral fertilizer);(4) 60%有机肥处理:有机肥的氮含量占总施氮量的 60%,其余 40%的氮为化肥氮(HOM: 60% organic matter plus 40% mineral fertilizer);(5) 无肥对照:不施任何肥料(CK: without fertilizer)。每个小区长 10.00 m,宽 6.67 m,面积 66.7 m^2,小区间用水泥埂隔开,埋深 100 cm,高出田面 35 cm。保证各小区不窜灌、窜排。由于该长期试验开始于 20 多年以前,受当时条件的限制没有设置重复。2014 年,早稻供试品种为湘早籼 45 号,4 月 1 日播种育苗,5 月 2 日进行大田耕地和施基肥,5 月 8 日移栽,7 月 24 日收获;晚稻供试品种为五优 308,6 月 25 日播种育苗,7 月 25 日进行大田耕地和施基肥,7 月 26 日移栽,10 月 26 日收获。早稻和晚稻均采用人工移栽,移栽行株距均为 25.0 cm×25.0 cm,均为二本栽插。

早稻和晚稻各施肥处理总施 N 分别为 142.5 kg/hm^2、P_2O_5 54.0 kg/hm^2、K_2O 63.0 kg/hm^2 和 157.5 kg/hm^2、P_2O_5 43.2 kg/hm^2、K_2O 81.0 kg/hm^2;早稻季和晚稻季秸秆还田量分别为 2775.0 kg/hm^2(秸秆中 N、P_2O_5、K_2O 含量分别为 0.65%、0.13%和 0.89%)和 3600.0 kg/hm^2(秸秆中 N、P_2O_5、K_2O 含量分别为 0.68%、0.15%和 0.91%);30%有机肥、60%有机肥处理的有机肥均为腐熟鸡粪,在早稻季和晚稻季的施用量分别为 2625.0、5250.0 kg/hm^2和 2670.0、5340.0 kg/hm^2(有机肥养分含量均为 N 1.77%、P_2O_5 0.80%和 K_2O 1.12%),各处理以等氮量为基准,不足的氮、磷、钾肥用化肥补足;早稻和晚稻各施肥处理的秸秆和有机肥均于稻田耕地时作基肥一次性施入;N 和 K_2O 作基肥和追肥 2 次施入,基肥在耕地时施入,追肥在移栽后 7 d 施用,基、追肥比例均按 7:3 施用;P_2O_5在耕地时作基肥一次性施入。各施肥处理每一年所使用的肥料种类及施用量均保持一致。早稻和晚稻田间管理为在移栽后保持浅水条件,结合施用分蘖肥进行杂草防除,分蘖期进行晒田,晒田后复水,后期进行干湿交替灌溉,水稻完熟后落干晒田、收获。其他管理措施同常规大田生产。

1.3 样品采集与测定方法

1.3.1 气体样品采集与测定

用静态暗箱-气相色谱法采集 CH_4气体。采样箱由 5 mm 厚 PVC 板制成,规格为 80 cm×80 cm×120 cm(长×宽×高),外部包有海绵和锡箔纸,以防止太阳照射导致的箱内气温变化过大。在 2014 年早稻和晚稻移栽后,分别于各个处理小区稻田内安装 3 次重复的静态箱底座,底座入土 5 cm,底座内均含有生长的水稻。在移栽后的第 2 d 开始进行气体采集,以后每隔 7 d 采集 1 次;每次气体样品采集时,每个处理均采集 3 次重复。每次采样时间为 9:00—11:00,取样时将采样箱垂直安放在底座凹槽内并用水密封,保证箱内气体与大气不进行气体交换。箱盖上装有 2 个小风扇,采样前将箱内顶部风扇打开,使箱内气体混和均匀。盖箱之后的 0、10、20、30 min 采样,用 50 mL 注射器从箱中抽取气体,通过旋转三通阀转移到 0.5 L 气体采样袋,备测。

CH_4浓度测定采用经改装的气相色谱(Agilent 7890A,美国)和自动进样器进行,检测器分别是火焰离子检测器(FID)和电子捕获检测器(ECD),进样口温度分别为 200℃和 330℃。分离材料为 PQ 填充柱,柱温 55℃。标准气体由国家标准物质中心提供。

稻田 CH_4[mg m^{-2} h^{-1})]排放通量的计算公式如下[20]:

$$F = \rho h\,[273.15/(273.15+T)]\,dC/dt$$

式中,F 为排放通量;ρ 为 CH_4标准状态下的密度(0.714 kg/m^3);h 为经过水层高度调整后采样箱顶部距水面的实际高度(m);dC/dt 为采样过程中采样箱内 CH_4的浓度变化率;T 为采样箱内的平均温度(℃)。

根据气样浓度与时间的关系曲线计算 CH_4的排放通量,然后计算水稻整个生长期 CH_4的排放总量(平均通量值与水稻整个生长期总小时数的乘积)[21-22]。

大气中某一气体的温室效应(GWPs)为该气体释放量与增温系数的乘积,而增温系数为单位质量的该气体引起的温室效应对应于相同效应的 CO_2的质量。在 100 年的时间尺度上,CH_4的增温系数为 25[2]。

1.3.2　土壤样品采集与测定

于 2014 年分别在早稻和晚稻的苗期、分蘖期、孕穗期、齐穗期、成熟期 10 个时期,进行了土壤样品的采集,每个小区用土钻通过 5 点取样法取 0—20 cm 土壤样品;每次取样时,于每个小区取 3 次重复的土壤样品。为避免表层土微生物受空气的影响,去除 0—5 cm 土壤,选用 5—15 cm 处土壤,剔除石砾及植物残体等杂物后,迅速装入塑料袋并置于冰盒中,运至实验室,4℃冰箱保存,用于土壤产甲烷古菌和甲烷氧化菌数量测定。产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量计数培养基的组成分别按钱泽澍和闵航[23]及许光辉和郑洪元[24]的方法,采用滚管法测定土样中甲烷氧化细菌的种群数量,分别取 0.5 mL 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和 10^{-7}的土样稀释液,接种于 3 支装有 4.5 mL 已融化的 45—50℃甲烷氧化菌固体培养基中,立即滚管,然后每支试管中加入 5 mL 甲烷气体,在 30℃恒温培养 7 d,计数试验内菌落的数量(菌落数在 20—100 以内的试管作为计数试管);采用 MPN 法测定产甲烷古菌种群的数量,取 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}和 10^{-7}的土样稀释液 0.5 mL,分别接种于 3 支装有 4.5 mL 产甲烷培养基中,然后加 0.1% Na_2S 和 5% $NaHCO_3$混合液和 0.1 mL 青霉素(50 mg/mL),在 30℃恒温培养 10 d。

于 11 月晚稻成熟收获时采集各处理 0—20 cm 土壤新鲜样品,风干过筛,用于测定土壤 pH 值(土:水=1:2.5)、有机质(重铬酸钾容量法)、全氮(重铬酸钾-硫酸消化法)、碱解氮(碱解扩散法)、有效磷($NaHCO_3$浸提–钼锑抗比色法)以及速效钾含量(NH_4Ac 浸提–火焰光度法)[25]。

1.4　数据处理

数据处理、相关分析采用 Excel 2003 软件进行,方差分析和多重比较采用 DPS 3.11 软件进行,多重比较采用 LSD 法($P<0.05$)。

2　结果与分析

2.1　长期施肥对稻田 CH_4排放通量的影响

早稻生育期,化肥(MF)、30%有机肥+70%化肥(LOM)、60%有机肥+40%化肥(HOM)和无肥(CK)处理稻田在插秧后第 24 天出现 CH_4排放高峰值,然后下降保持较低的水平;而秸秆还田+化肥(RF)处理在插秧后第 33 天出现 CH_4排放高峰值。在早稻整个生长期,各处理稻田 CH_4排放通量大小顺序表现为:HOM>LOM>RF>MF>CK(图 1)。

晚稻生育期,各处理稻田 CH_4排放通量主要集中在分蘖期,均在插秧后第 24 天出现排放峰值,然后下降保持较低的水平至水稻成熟收获。在晚稻整个生长期,各处理稻田 CH_4排放通量大小顺序表现为:HOM>LOM>RF>MF>CK(图 1)。

2.2　长期施肥对稻田 CH_4排放量的影响

水稻生长期稻田 CH_4总排放量为早稻和晚稻季排放量之和。早稻和晚稻生育期,HOM、LOM、RF 和 MF 处理稻田 CH_4总排放量分别为 5.074、4.521、4.418、3.470 g/m^{2}和 6.099、4.881、3.961、3.212 g/m^2;其中 MF、RF、LOM 和 HOM 处理稻田 CH_4总排放量均显著高于 CK 处理,各处理间稻田 CH_4总排放量差异达显著差异($P<0.05$)。早稻和晚稻生育期,各处理稻田 CH_4总排放量大小顺序均表现为:HOM>LOM>RF>MF>CK(表 1)。水

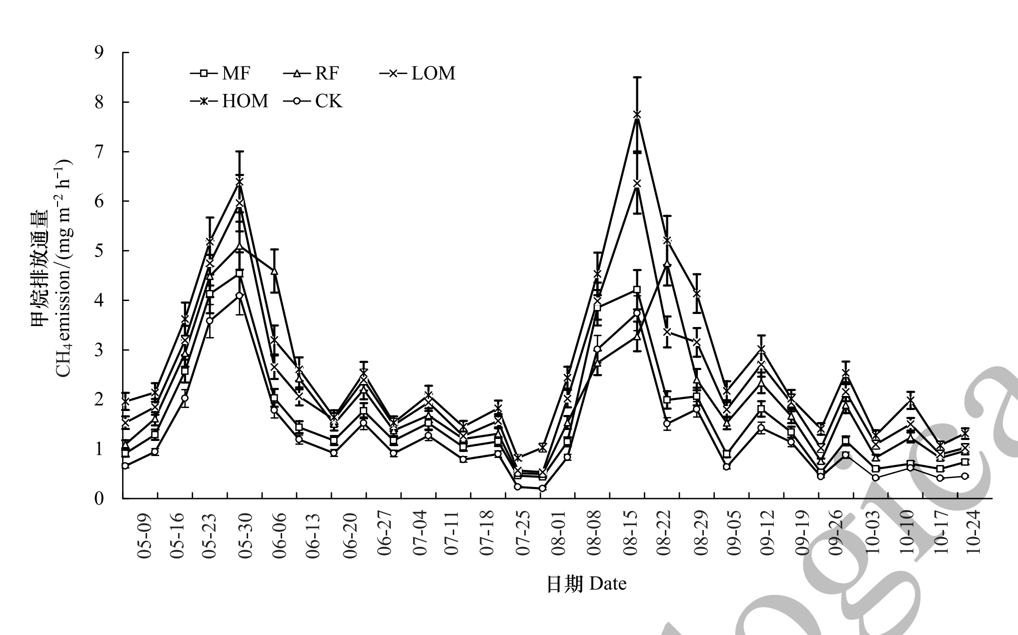


图 1 长期施肥对水稻生育期稻田甲烷排放通量的影响

Fig.1 Effects of different long-term fertilizer treatments on CH_4 fluxes from paddy field during early and late rice whole growth periods

MF:化肥 Mineral fertilizer alone;RF:秸秆还田 Rice residues plus mineral fertilizer;LOM:30%有机肥+70%化肥 30% Organic matter plus 70% mineral fertilizer;HOM:60%有机肥+40%化肥 60% Organic matter plus 40% mineral fertilizer;CK:无肥 Without fertilizer

稻生长期稻田 CH_4总排放量以 HOM 处理为最高,达 11.172 g/m^2,比 CK 处理增加 105.56%,其次是 LOM 和 RF 处理,分别为 9.401 g/m^{2}和 8.379 g/m^2,分别比 CK 处理增加 72.97%和 54.17%,CK 处理为最低,为 5.435 g/m^2;各处理间稻田 CH_4总排放量差异达显著差异(P< 0.05)。

表 1 不同施肥处理对早稻和晚稻生育期稻田 CH_4排放量的影响/(g/m^2)

Table 1 Effects of long-term fertilizer treatments on CH_4 emission from paddy field during whole growth period of early and late rice

处理 Treatment	早稻 Early rice	晚稻 Late rice	总和 Total
MF	3.470±0.147c	3.212±0.176d	6.682±0.323d
RF	4.418±0.131b	3.961±0.141c	8.379±0.271c
LOM	4.521±0.128b	4.881±0.114b	9.401±0.242b
HOM	5.074±0.100a	6.099±0.093a	11.172±0.193a
CK	2.886±0.083d	2.548±0.074e	5.435±0.157e

MF:化肥 Mineral fertilizer alone;RF:秸秆还田 Rice residues plus mineral fertilizer;LOM:30%有机肥+70%化肥 30% Organic matter plus 70% mineral fertilizer;HOM:60%有机肥+40%化肥 60% Organic matter plus 40% mineral fertilizer;CK:无肥 Without fertilizer; 同列数据后不同小写字母表示差异达到 5%的显著水平

2.3 长期施肥对稻田甲烷综合温室效应的影响

全球增温潜势(GWPs)能反应不同温室气体对温室效应增强的相对辐射效应。在本研究中,整个水稻生长期(早稻和晚稻)各个处理间稻田 CH_4气体的 GWPs 差异达显著水平,其大小顺序表现为 HOM>LOM>RF>MF>CK;其中,以 HOM 处理稻田 CH_4温室效应最大,为 2797.01 kg CO_2-eq/hm^2,LOM 和 RF 处理次之,分别为 2353.63 kg CO_2-eq/hm^{2}和 2097.71 kg CO_2-eq/hm^2,CK 处理最低,为 1360.55 kg CO_2-eq/hm^2。

表 2 中表明,RF 处理双季水稻产量为最高,CK 处理最低。通过对单位温室效应产量计算结果表明,HOM 处理的单位温室效应产量为最高,其次是 CK 处理,LOM 处理次之,RF 和 MF 处理单位温室效应产量为最低。

表 2　不同施肥处理早稻和晚稻生育期稻田 CH_4 排放的综合温室效应

Table 2　Double rice grain yield, global warming potentials (GWPs) of CH_4 and per yield GWPs from paddy field under long-term fertilizer treatments

处理 Treatment	CH_4排放量/(g/m^2) CH_4 emission	CH_4温室效应/(kg CO_2/hm^2) GWPs of CH_4	双季水稻产量/(kg/hm^2) Early and late rice grain yield	单位温室效应产量/(kg/kg) Per yield GWPs CO_2
MF	6.682±0.323d	1672.79±80.74d	10479.5	0.16±0.01c
RF	8.379±0.271c	2097.71±67.94c	12098.0	0.17±0.01c
LOM	9.401±0.242b	2353.63±60.56b	10935.5	0.22±0.01b
HOM	11.172±0.193a	2797.01±48.29a	11038.5	0.25±0.01a
CK	5.435±0.157e	1360.55±39.28e	5722.5	0.24±0.01a

2.4　长期施肥对土壤产甲烷古菌数量的影响

早稻各个主要生育时期,各施肥处理的稻田土壤产甲烷古菌数量呈抛物线变化趋势,苗期到分蘖期不断增加,于分蘖期达到最高值,之后呈下降的变化趋势。HOM 处理土壤产甲烷古菌数量最高,显著高于其他处理;其次是 LOM 和 RF 处理,均显著高于 MF 和 CK 处理;各处理土壤产甲烷古菌数量大小顺序表现为 HOM>LOM>RF>MF>CK(图 2)。

晚稻各个主要生育时期,各施肥处理稻田土壤产甲烷古菌数量的变化与早稻生育期相似,表现为 HOM>LOM>RF>MF>CK,以 HOM 处理土壤产甲烷古菌数量为最高,且各处理间显著差异(图 2)。

2.5　长期施肥对土壤甲烷氧化菌数量的影响

早稻苗期到分蘖期以及晚稻各个主要生育时期,各施肥处理稻田土壤甲烷氧化菌数量不断增加,于分蘖期达到最高值,之后呈下降的变化趋势(图 3)。早稻各个主要生育时期,HOM 处理稻田土壤甲烷氧化菌数量为最高,均显著高于 RF、MF 和 CK 处理;其次是 LOM 和 RF 处理,均显著高于 CK 处理;各处理土壤甲烷氧化菌数量大小顺序表现为 HOM>LOM>RF>MF>CK(图 3)。

2.6　甲烷排放通量与土壤产甲烷古菌和甲烷氧化菌数量的关系

双季稻稻田甲烷排放通量与稻田土壤产甲烷古菌的数量存在极显著的正相关关系。稻田甲烷排放通量与稻田土壤甲烷氧化菌数量存在正相关的关系,但是相关性不显著;土壤产甲烷古菌数量与甲烷氧化菌数量存在极显著的正相关关系(表 3)。

表 3　稻田甲烷排放通量与土壤产甲烷古菌和甲烷氧化菌数量的相关性分析

Table 3　Correlation between CH_4 emission and the number of methanogens and methanotrophs

指标 Parameters	CH_4排放 CH_4 emission	产甲烷古菌数量 The number of methanogens	甲烷氧化菌数量 The number of methanotrophs
CH_4排放 CH_4 emission	1	0.967**	0.014
产甲烷古菌数量 The number of methanogens		1	0.993**
甲烷氧化菌数量 The number of methanotrophs			1

* 和 ** 分别表示 5% 和 1% 水平显著相关

2.7　长期施肥对土壤化学性质的影响

与 CK 处理相比,有机肥配合施用化肥可以显著提高土壤有机质、全氮、碱解氮、有效磷和速效钾含量(表 4)。其中,HOM 处理稻田土壤有机质、全氮、碱解氮、有效磷和速效钾含量均为最高,分别比 CK 处理增加28.0 g/kg、1.77 g/kg、157.0 mg/kg、234.21 mg/kg 和 14.0 mg/kg;LOM 处理较 MF、RF 和 CK 处理提高了土壤的养分含量,但其含量均低于 HOM 处理。RF 和 MF 处理土壤有机质、全氮、碱解氮和速效钾含量均显著高于 CK 处理,而有效磷与 CK 处理均无显著差异。各处理间土壤 pH 值差异不大。

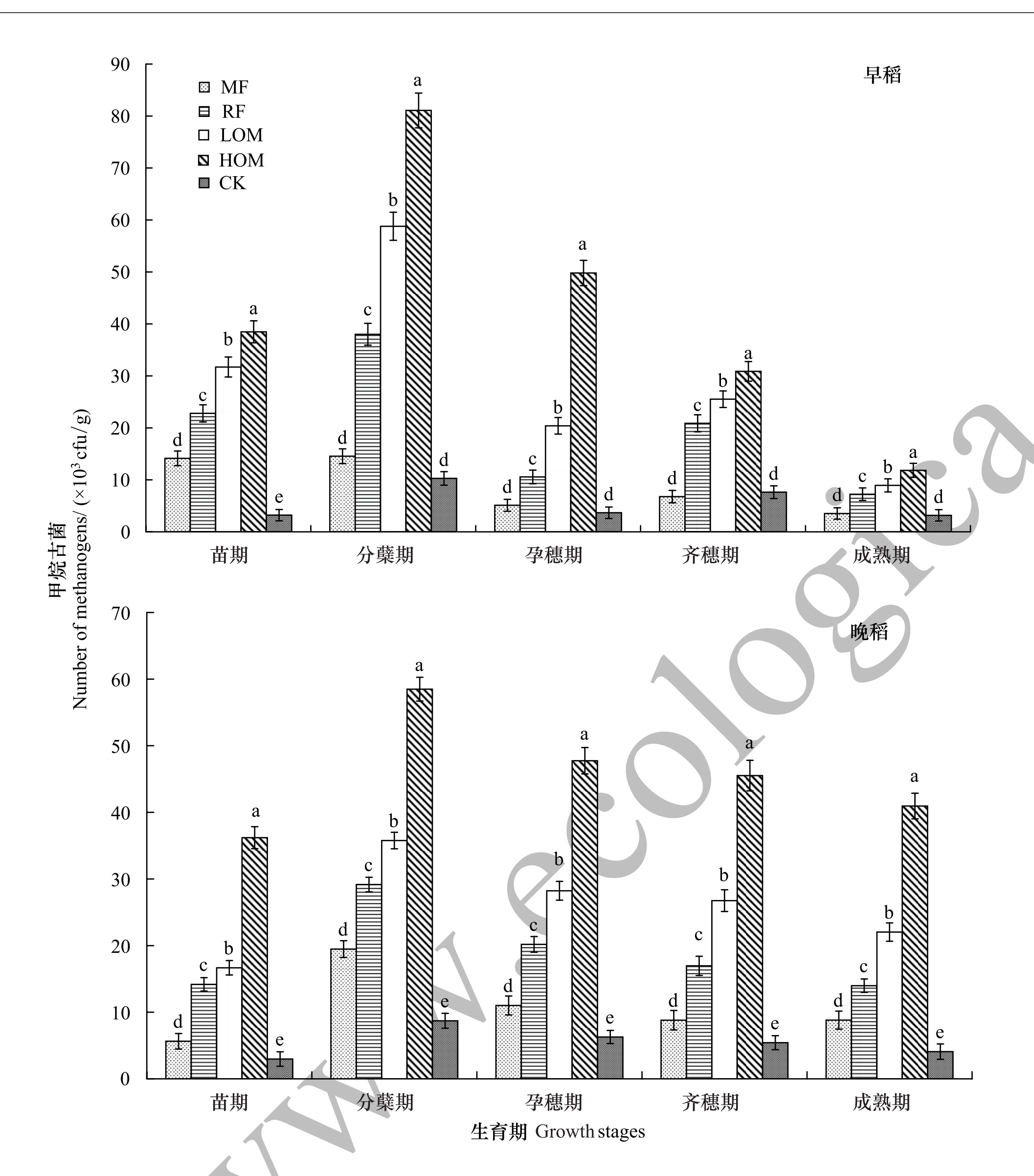


图 2 长期施肥对水稻主要生育时期土壤产甲烷古菌数量的影响

Fig.2 Effects of different long-term fertilizer treatments on the number of methanogens in paddy field at early and late rice main growth stages

图柱上不同小写字母表示差异达到 5%的显著水平

表 4 长期施肥对稻田土壤化学性质的影响(0—20 cm)

Table 4 Effects of different long-term fertilizer managements on soil chemical properties (0—20 cm)

处理 Treatment	pH	全氮 Total N/ (g/kg)	碱解氮 Available N/ (mg/kg)	有效磷 Available P/ (mg/kg)	速效钾 Available K/ (mg/kg)	有机质 Organic matter/ (g/kg)
MF	6.33±0.19a	1.77±0.09c	128±4.30d	10.20±0.29c	29±0.98c	27.6±1.06d
RF	6.65±0.18a	2.11±0.06b	166±3.37c	12.30±0.36c	31±0.89c	34.3±1.10c
LOM	6.37±0.19a	2.21±0.06b	186±4.79b	129.30±2.73b	34±0.84b	38.0±0.99b
HOM	6.73±0.18a	3.18±0.05a	253±3.69a	243.80±3.04a	40±1.15a	50.5±0.79a
CK	6.67±0.19a	1.41±0.04d	96±2.77e	9.59±0.28c	26±0.75d	22.5±0.65e

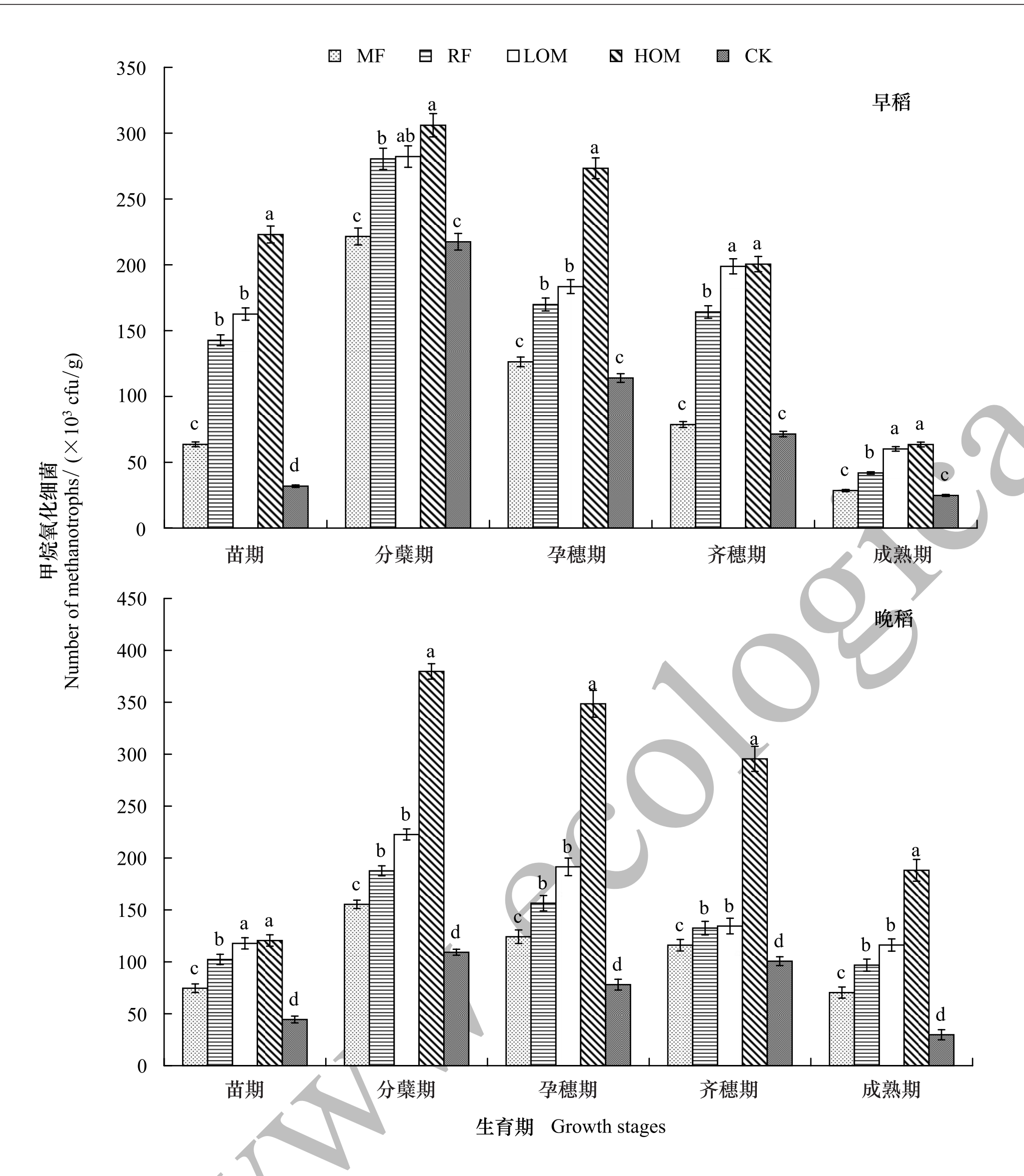


图 3　长期施肥对水稻主要生育时期土壤甲烷氧化菌数量的影响

Fig.3　Effects of different long-term fertilizer treatments on the number of methanotrophs in paddy field at early and late rice main growth stages

3　讨论

3.1　长期施肥与稻田 CH_4 排放及全球增温潜势的关系

CH_4 排放是一个复杂的过程,它包括产生、氧化和排放等过程。前人的研究结果表明,施用氮肥促进了稻田 CH_4 的排放[26-29]。本研究中,早稻和晚稻生育期,秸秆还田、有机肥配施化肥(RF、LOM 和 HOM)处理稻田 CH_4 排放通量、排放量和土壤产甲烷古菌、甲烷氧化细菌数量均明显高于无肥对照(CK),这与 Wang 等[16]研究结果相一致。其原因是:(1)长期施入有机肥和秸秆还田后,有利于改善土壤部分理化特性,培肥土壤(表 4),并能为土壤微生物活动提供碳源和能量,增强了土壤生物活动,同时也加速土壤中氧气的消耗量、降低了土壤 Eh 值;(2)由于长期大量碳源(秸秆和有机肥)加入使土壤有机碳源同化作用加强[30],为稻田 CH_4 产生提供了底物,且土壤生态环境较好,促进了土壤微生物大量繁殖(图 2);(3)长期有机无机肥配合施用促进了作物根系生长,水稻根系分化养分能力增强,根系分泌物、脱落物增加,也促进了土壤微生物的繁殖[31]。

各处理稻田 CH_4 排放通量和排放量与土壤部分理化特性关系密切。在本研究各个施肥处理,LOM 和

HOM 处理稻田 CH_4排放通量和排放量均为最高,其原因是长期有机肥与化肥配合施用有利于改善土壤部分理化性质,长期有机物的投入使微生物量碳发生变化,提高了土壤有机碳积累和速效养分含量(表 4),为土壤微生物活性提高提供了较好的土壤生态环境,从而促进了稻田 CH_4排放。RF 处理稻田 CH_4排放通量和排放量均高于长期单独施用化肥(MF)和 CK 处理,但均低于 HOM 和 LOM 处理,其原因为长期采用秸秆还田,与长期单独施用化肥和无肥处理相比,有较多的秸秆碳被微生物分解转化为有机质,有机质又被土壤微生物吸收并成为其机体的一部分,虽提高了土壤有机碳积累和 CH_4排放相应的土壤关键功能微生物数量(表 4、图 2 和图 3),但其土壤有机碳积累、速效养分含量和关键功能微生物数量均低于长期有机无机肥配合施用处理[32]。与 RF、LOM 和 HOM 处理相比,MF 降低了稻田 CH_4排放通量,其原因可能是缺少有机氮肥施入,影响了土壤部分理化性质的变化,造成土壤中存在过量的无机氮肥水平,使土壤 C/N 比降低,加速了土壤中原有有机碳分解,导致土壤中积累的有机碳总量、速效养分含量较少(表 4),影响了产甲烷古菌活动,从而降低了 CH_4排放。

全球增温潜势(GWPs)作为一种相对的指标常用来估计不同温室气体对气候系统的潜在效应。Tang 等[33]发现,冬季作物秸秆还田促进了双季稻田的 GWPs。Zhu 等[34]研究认为,冬季作物-双季稻多熟种植模式条件下,紫云英秸秆还田处理具有最高的 GWPs。本研究结果表明,与 RF 和 MF 处理相比,LOM 和 HOM 处理促进了稻田 CH_4排放量,因此具有更大的 GWPs。施用有机肥和秸秆还田处理周年水稻产量均明显高于 CK 处理,但 RF 处理单位温室效应产量均显著低于 LOM、HOM 和 CK 处理。因此,在长江中下游双季稻区可采取秸秆还田的施肥模式,有利于减少化学氮肥施用量、减轻稻田温室气体排放和维持水稻产量。

3.2 稻田 CH_4排放与关键功能微生物数量变化的关系

稻田 CH_4的生成要经过一系列复杂的生物化学反应,是产甲烷古菌和甲烷氧化细菌相互作用的结果,其数量和活性受许多因素的影响,如耕作制度、作物种类、土壤类型、施肥种类和方式、水分管理等措施[15,35-37],其中施肥是影响其数量和活性的关键因素之一。本研究采用传统的技术手段测定结果表明,产甲烷古菌数量一般比同期测定的甲烷氧化菌数量低,但水稻生长过程中稻田有一定数量的 CH_4释放,这表明稻田土壤产甲烷古菌的甲烷形成活性高于甲烷氧化菌的甲烷氧化活性[38]。同时,稻田 CH_4排放通量在分蘖期出现高峰时,土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量均为高值;而在稻田 CH_4排放通量为低峰时,土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量也较低,这表明土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量的多少与 CH_4排放通量高低关系密切,统计结果表明稻田 CH_4排放通量与土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量均呈正相关关系,与稻田土壤产甲烷古菌的数量存在极显著的正相关关系(表 3),在类似的长期定位试验条件下还未见相关报道,但在不同水稻土类型条件下有相似的研究结果[39];同时,本研究采用传统的技术手段对于甲烷氧化菌和产甲烷古菌数量之间关系的研究结果,这与目前他人采用现代分子生物学方法进行土壤微生物群落结构和数量测试的研究结果相似[40]。在本研究中,各处理稻田土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量大小顺序与其 CH_4排放通量大小顺序相一致,这可能是外界环境因素合适时促进了产甲烷微生物的活动,导致 CH_4排放增加,由于环境中 CH_4浓度的增加,进而刺激了甲烷氧化微生物的活动。

在开展研究的双季稻主产区,晚稻生育期的气温均高于早稻生育期[41],早稻和晚稻生育期稻田土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量均存在差异(图 2 和图 3),这也是造成早、晚稻季稻田 CH_4排放出现差异重要的环境因素。各处理稻田 CH_4排放的土壤关键功能微生物数量与土壤部分理化特性关系密切。在各个施肥处理,LOM 和 HOM 处理稻田土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量均为最高,其原因可能是长期有机肥与化肥配合施用有机物的投入使微生物量碳发生变化,提高了土壤有机碳积累及改善了土壤部分速效养分含量(表 4),从而促进了土壤微生物的活性和数量。MF 处理稻田土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量低于 RF、LOM 和 HOM 处理,其原因可能是一方面长期施用化肥水稻植株生长状况较差,根系及残留物都较少,且长期施用无机氮肥,使土壤 C/N 比降低,加速了土壤中原有有机碳分解,降低了土壤有机碳和部分土壤速效养分含量,减少了土壤微生物的反应底物和土壤微生物生物量[42];另一方面长期单独施用化肥,造成稻田土壤中存在过

量的无机氮肥水平和土壤部分理化特性发生明显的变化,与 RF、LOM 和 HOM 处理相比,降低了土壤部分养分含量(表 4),影响了土壤微生物活性碳源和能量的来源,从而降低了产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量。

4　结论

不同施肥处理对双季稻田 CH_4排放具有明显的影响,与无肥稻田相比,采取施肥处理均促进了稻田生态系统 CH_4的排放。早稻和晚稻生长期,各处理稻田 CH_4排放通量和总排放量均表现为 60%有机肥+40%化肥>30%有机肥+70%化肥>秸秆还田>化肥>无肥。各处理稻田 CH_4的全球增温潜势差异达显著水平,其大小顺序表现为 60%有机肥+40%化肥>30%有机肥+70%化肥>秸秆还田>化肥>无肥;60%有机肥+40%化肥处理的单位温室效应产量为最高,其次是无肥处理,30%有机肥+70%化肥处理次之,秸秆还田和化肥处理单位温室效应产量为最低。

双季稻田 CH_4排放与土壤产甲烷古菌和甲烷氧化细菌数量关系密切。早稻和晚稻各个主要生育时期,均以 60%有机肥+40%化肥处理稻田土壤产甲烷古菌数量为最高,均显著高于其他处理,其大小顺序表现为 60%有机肥+40%化肥>30%有机肥+70%化肥>秸秆还田>化肥>无肥。早稻和晚稻各个主要生育时期,各施肥处理稻田土壤甲烷氧化菌数量大小顺序均表现为 60%有机肥+40%化肥>30%有机肥+70%化肥>秸秆还田>化肥>无肥。

参考文献(References):

[1] Ghosh S, Majumdar D, Jain M C. Methane and nitrous oxide emissions from an irrigated rice of North India. Chemosphere, 2003, 51(3): 181-195.

[2] Bhatia A, Pathak H, Jain N, Singh P K, Singh A K. Global warming potential of manure amended soils under rice-wheat system in the Indo-Gangetic plains. Atmospheric Environment, 2005, 39(37): 6976-6984.

[3] Vergé X P C, De Kimpe C, Desjardins R L. Agricultural production, greenhouse gas emissions and mitigation potential. Agricultural and Forest Meteorology, 2007, 142(2/4): 255-269.

[4] 田光明, 何云峰, 李勇先. 水肥管理对稻田土壤甲烷和氧化亚氮排放的影响. 土壤与环境, 2002, 11(3): 294-298.

[5] 辛良杰, 李秀彬. 近年来我国南方双季稻区复种的变化及其政策启示. 自然资源学报, 2009, 24(1): 58-65.

[6] Riya S, Muroi Y, Kamimura M, Zhou S, Terada A, Kobara Y, Hosomi M. Mitigation of CH_4 and N_2O emissions from a forage rice field fertilized with aerated liquid fraction of cattle slurry by optimizing water management and topdressing. Ecological Engineering, 2015, 75: 24-32.

[7] 唐海明, 肖小平, 帅细强, 汤文光, 林叶春, 汤海涛, 杨光立. 双季稻田种植不同冬季作物对甲烷和氧化亚氮排放的影响. 生态学报, 2012, 32(5): 1481-1489.

[8] 陈苇, 卢婉芳, 段彬伍, Wassmann R, Lantin R S. 猪粪与沼气渣对双季稻田甲烷排放的影响. 生态学报, 2001, 21(2): 265-270.

[9] 江长胜, 王跃思, 郑循华, 王明星. 稻田甲烷排放影响因素及其研究进展. 土壤通报, 2004, 35(5): 663-669.

[10] 吕琴, 闵航, 陈中云. 长期定位试验对水稻田土壤甲烷氧化活性和甲烷排放通量的影响. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(6): 608-612.

[11] 郭腾飞, 梁国庆, 周卫, 刘东海, 王秀斌, 孙静文, 李双来, 胡诚. 施肥对稻田温室气体排放及土壤养分的影响. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 337-345.

[12] Zou J W, Huang Y, Jiang J Y, Zheng X H, Sass R L. A 3-year field measurement of methane and nitrous oxide emissions from rice paddies in China: Effects of water regime, crop residue, and fertilizer application. Global Biogeochemical Cycles, 2005, 19(2): GB2021.

[13] Zhao X, Wang J W, Wang S Q. Successive straw biochar application as a strategy to sequester carbon and improve fertility: a pot experiment with two rice/wheat rotations in paddy soil. Plant and Soil, 2014, 378(1/2): 279-294.

[14] Das S, Adhya T K. Effect of combine application of organic manure and inorganic fertilizer on methane and nitrous oxide emissions from a tropical flooded soil planted to rice. Geoderma, 2014, 213: 185-192.

[15] Ma J, Xu H, Yagi K, Cai Z C. Methane emission from paddy soils as affected by wheat straw returning mode. Plant and Soil, 2008, 313(1/2): 167-174.

[16] Wang J Y, Chen Z Z, Ma Y C, Sun L Y, Xiong Z Q, Huang Q W, Sheng Q R. Methane and nitrous oxide emissions as affected by organic-inorganic mixed fertilizer from a rice paddy in southeast China. Journal of Soils and Sediments, 2013, 13(8): 1408-1417.

[17] Yue J, Shi Y, Liang W, Wu J, Wang C R, Huang G H. Methane and nitrous oxide emissions from rice field and related microorganism in black

soil, northeastern China. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2005, 73(2/3): 293-301.

[18] Sethunathan N, Kumaraswamy S, Rath A K, Ramakrishnan B, Satpathy S N, Adhya T K, Rao V R. Methane production, oxidation, and emission from Indian rice soils. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2000, 58(1/3): 377-388.

[19] 侯爱新, 陈冠雄, 吴杰, 王正平, Van Cleemput O. 稻田 CH_4 和 N_2O 排放关系及其微生物学机理和一些影响因子. 应用生态学报, 1997, 8(3): 270-274.

[20] Liebig M A, Tanaka D L, Gross J R. Fallow effects on soil carbon and greenhouse gas flux in central North Dakota. Soil Science Society of America Journal, 2010, 74(2): 358-365.

[21] Parashar D C, Gupta P K, Rai J, Sharma R C, Singh S N. Effect of soil temperature on methane emission from paddy fields. Chemosphere, 1993, 26(1/4): 247-250.

[22] Singh J S, Singh S, Raghubanshi A S, Singh S, Kashyap A K. Methane flux from rice/wheat agroecosystem as affected by crop phenology, fertilization and water level. Plant and Soil, 1996, 183(2): 323-327.

[23] 钱泽澍, 闵航. 沼气发酵微生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986.

[24] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 中国农业出版社, 1986: 102-136.

[25] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000: 25-108.

[26] Chu H Y, Hosen Y K, Yagi K. NO, N_2O, CH_4 and CO_2 fluxes in winter barley field of Japanese Andisol as affected by N fertilizer management. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(1): 330-339.

[27] Hu R G, Hatano R, Kusa K, Sawamoto T. Effect of nitrogen fertilization on methane flux in a structured clay soil cultivated with onion in central Hokkaido, Japan. Soil Science and Plant Nutrition, 2002, 48(6): 797-804.

[28] Bronson K F, Mosier A R. Suppression of methane oxidation in aerobic soil by nitrogen fertilizers, nitrification inhibitors, and urease inhibitors. Biology and Fertility of Soils, 1994, 17(4): 263-268.

[29] 周文鳞, 娄运生. 控释氮肥对抗除草剂转基因水稻田土壤甲烷排放的影响. 生态学报, 2014, 34(16): 4555-4560.

[30] 贾伟, 周怀平, 解文艳, 关春林, 郜春花, 石彦琴. 长期有机无机肥配施对褐土微生物生物量碳、氮及酶活性的影响. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(4): 700-705.

[31] 王忠华, 叶庆富, 舒庆尧, 崔海瑞, 夏英武, 周美园. 转基因植物根系分泌物对土壤微生态的影响. 应用生态学报, 2002, 13(3): 373-375.

[32] 李娟, 赵秉强, 李秀英, So H B. 长期有机无机肥料配施对土壤微生物学特性及土壤肥力的影响. 中国农业科学, 2008, 41(1): 144-152.

[33] Tang H M, Xiao X P, Tang W G, Wang K, Sun J M, Li W Y, Yang G L. Effects of winter cover crops straws incorporation on CH_4 and N_2O emission from double-cropping paddy fields in southern China. PLoS One, 2014, 9(10): e108322.

[34] Zhu B, Yi L X, Hu Y G, Zeng Z H, Tang H M, Yang G L, Xiao X P. Effects of Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) residue incorporation on CH_4 and N_2O emission from a double-rice paddy soil. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(9): 1537-1544.

[35] 郑聚锋, 张平究, 潘根兴, 李恋卿, 张旭辉. 长期不同施肥下水稻土甲烷氧化能力及甲烷氧化菌多样性的变化. 生态学报, 2008, 28(10): 4864-4872.

[36] Parkin T B, Kaspar T C. Temperature controls on diurnal carbon dioxide flux. Soil Science Society of America Journal, 2003, 67(6): 1763-1772.

[37] 丁维新, 蔡祖聪. 土壤有机质和外源有机物对甲烷产生的影响. 生态学报, 2002, 22(10): 1672-1679.

[38] 闵航, 陈美慈, 钱泽澍. 不同栽培措施对水稻田甲烷释放甲烷产生菌和甲烷氧化菌的影响. 农业环境保护, 1994, 13(1): 7-11.

[39] 陈中云, 闵航, 陈美慈, 赵宇华. 不同水稻土甲烷氧化菌和产甲烷菌数量与甲烷排放量之间相关性的研究. 生态学报, 2001, 21(9): 1498-1505.

[40] 李大明, 成艳红, 刘满强, 秦江涛, 焦加国, 李辉信, 胡锋. 双季稻田甲烷排放与土壤产甲烷菌群落结构和数量关系研究. 农业环境科学学报, 2013, 32(4): 866-873.

[41] 徐一兰, 唐海明, 肖小平, 郭立君, 李微艳, 孙继民. 长期施肥对双季稻田土壤微生物学特性的影响. 生态学报, 2016, 36(18): 5847-5855.

[42] 徐阳春, 沈其荣, 雷宝坤, 储国良, 王全洪. 水旱轮作下长期免耕和施用有机肥对土壤某些肥力性状的影响. 应用生态学报, 2000, 11(4): 549-552.